

بررسی شیوع استافیلوکوک آرنوس مقاوم به متی‌سیلین با روش‌های انتشار از دیسک و مولکولی در بخش‌های مراقبت‌های ویژه و اورژانس در یکی از بیمارستان‌های آموزشی تهران

شفیع قربانی طازاندره^۱، دکتر عباسعلی ایمانی فولادی^{۲*}، دکتر محمدرضا نورانی^۳

تاریخ دریافت: 1391/09/10، تاریخ پذیرش: 1391/12/03

چکیده

پیش زمینه و هدف: استافیلوکوک آرنوس مقاوم به متی‌سیلین یک پاتوژن عمده و مهم در ایجاد عفونت‌های جدی در ایران و سایر کشورها است. به دلیل شیوع مقاومت به اغلب آنتی‌بیوتیک‌های رایج، درمان و مبارزه علیه آن بسیار مشکل شده است. بنابراین هدف این مطالعه تعیین فراوانی ژن مقاومت به متی‌سیلین در ایزوله‌های استافیلوکوکوس آرنوس به روش PCR و بررسی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی نسبت اگزاسیلین و دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها به روش انتشار از دیسک می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه در طی سال ۱۳۹۰ بر روی ۷۳ نمونه از استافیلوکوکوس آرنوس جداسازی شده از دو بخش مراقبت‌های ویژه و اورژانس صورت گرفت. در این تحقیق تشخیص فنوتیپی به روش انتشار از دیسک انجام شد، و به منظور تشخیص ژنوتیپی یک جفت آغازگر اختصاصی جهت تشخیص ژن *mecA* توسط نرم‌افزار AlleleID (version 6) طراحی و توسط شرکت سیناژن سنتز شد. سپس تشخیص این ژن با آغازگرهای طراحی شده بهینه‌سازی شد، و شیوع آن از نمونه جدا شده از دو بخش مراقبت‌های ویژه و اورژانس، به روش PCR مورد تایید قرار گرفت.

یافته‌ها: یافته‌های این بررسی به روش PCR نشان داد که از ۷۳ ایزوله بدست آمده از نمونه‌های بالینی، ۸۹ درصد سویه‌ها (۶۵ مورد) ژن مقاومت به متی‌سیلین را دارند. ولی در بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار از دیسک، فقط ۷۴ درصد سویه‌ها (۵۴ مورد) مقاومت به اگزاسیلین را نشان دادند. **بحث و نتیجه‌گیری:** نتایج این پژوهش به روش PCR نشان می‌دهد که از ۷۳ نمونه بالینی، ۸۹ درصد ایزوله‌ها ژن مقاومت به متی‌سیلین را نشان می‌دهند، و در بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن آگار، فقط ۷۴ درصد مقاومت را نشان داده‌اند. به عنوان نتیجه‌گیری، مقاومت به متی‌سیلین در استافیلوکوکوس آرنوس به ۸۹ درصد رسیده است و میزان مقاومت چند آنتی‌بیوتیکی به بیش از ۹۵ درصد رسیده است.

کلیدواژه‌ها: استافیلوکوک آرنوس، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، متی‌سیلین، MRSA

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و چهارم، شماره دوم، ص ۱۲۰-۱۱۰، اردیبهشت ۱۳۹۲

آدرس مکاتبه: مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)

Email: imanifouladi.a@gmail.com

مقدمه

نسبت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله بتالاکتام‌ها، آمینوگلیکوزیدها، تتراسایکلین‌ها، فلوروکوئینولون‌ها و ماکرولیدها کسب کرده است (۱). بنابراین امروزه تعداد محدودی از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان داروهای ضد استافیلوکوکی همچون ونکومايسين و تیکوپلانتین در دسترس هستند (۴، ۵).

استافیلوکوکوس آرنوس به‌عنوان یک عامل بیماری‌زای قدرتمند که عفونت‌های متعددی را ایجاد می‌کند، شناخته شده است (۱). استافیلوکوکوس آرنوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA)^۴ همچنین یکی از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی و اکتسابی از جامعه است (۲، ۳) که امروزه مقاومت چندگانه‌ای را

^۱ کارشناس ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، زنجان، ایران

^۲ دانشیار مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) (نویسنده مسئول)

^۳ دانشیار مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)

^۴ Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus

به علت بالا بودن میزان مرگ و میر ناشی از عفونت‌های بیمارستانی سویه‌های MRSA، تعیین الگوی مقاومت منطقه‌ای و محلی به منظور راهنمایی مناسب جهت استفاده از آنتی‌بیوتیک مناسب در درمان عفونت‌های ایجاد شده به وسیله سویه‌های MRSA ضروری است (۱۰). شیوع MRSA به مقدار زیادی در بین کشورهای مختلف و حتی از یک بیمارستان به بیمارستان دیگر در یک کشور متفاوت است. بنابراین تعیین الگوی مقاومت منطقه‌ای و جغرافیای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سطح یک کشور به منظور راهنمای مناسب جهت درمان عفونت‌ها MRSA و کنترل آن کاملاً ضروری و مناسب می‌باشد ثابت شده است که محل جغرافیایی می‌تواند یک فاکتور ریسک برای نشان دادن عفونت‌های MRSA باشد (۱۷). بر این اساس، نه تنها با تشخیص این ایزوله‌ها، می‌توان از تجویز نابجای آنتی‌بیوتیک‌ها در مورد بیماران جلوگیری کرد، بلکه از گسترش ایزوله‌ها مقاوم به دارو در بیمارستان‌ها مختلف جلوگیری خواهد شد. بنابراین هدف از این مطالعه شناسائی و تعیین فراوانی سویه‌های MRSA به دو روش فنوتیپی و مولکولی در ایزوله‌های بالینی جدا شده از دو بخش مراقبت‌های ویژه و اورژانس بود.

مواد و روش‌ها

تعداد ۷۳ ایزوله استافیلوکوکوس آرتوس از دو بخش مراقبت‌های ویژه و اورژانس در یکی از بیمارستان‌های آموزشی تهران به ترتیب با فراوانی (۵۲/۱٪) و ۳۸ (۴۷/۹٪) در طی سال ۱۳۹۰ جمع آوری شدند. همه‌ی ایزوله‌ها با تست‌های بیوشیمیایی نظیر رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، کوآگولاز، تست DNase و تخمیر قند مانیتول (سیگما، آمریکا) تایید گردیدند (۱۸).

- تعیین فنوتیپی استافیلوکوکوس آرتوس مقاوم به متی

سیلین

آنتی‌بیوگرام به روش انتشار از دیسک با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک (پادتن طب، ایران) در محیط مولر-هینتون آگار (مرک، آلمان) بر اساس دستورالعمل CSLI^۴ انجام شد (۱۸). حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آگراسیلین (۱ μg)، اریتروماکسین (۱۰ μg)، آمپی‌سیلین (۱۰ μg)، آموکسی‌سیلین (۱۰ μg)، ایمپنم (۱۰ μg)، پنی‌سیلین (۱۰ un)، تتراسایکلین (۳۰ μg)، داکسی‌سایکلین (۳۰ μg)، سفتریاکسون (۳۰ μg)، سیپرفلوکساسین (۵ μg)، کلرامفنیکل (۳۰ μg)، سینوکساسین (۱۰۰ μg)، کلیندامایسین (۲ μg)، کوتریموکسازول (۲۳/۷۵ μg) و ونکوماکسین (۳۰ μg) تعیین شد.

درمان عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس آرتوس تا قبل از سال ۱۹۵۰، شامل تجویز پنی‌سیلین G بود، به دلیل رشد روز افزون مقاومت به پنی‌سیلین‌ها در اواخر ۱۹۵۰ نگرانی فزاینده‌ای را به وجود آمد (۶).

سویه‌های مقاوم به طور تپیک تولید آنزیمی به نام بتالاکتاماز می‌کردند که در اثر آن حلقه بتالاکتام، آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام مقاوم به هیدرولیز آنزیم بتالاکتاماز شدند، نتیجه این تلاش‌ها در سال ۱۹۵۹ به سنتز آنتی‌بیوتیک‌ها نیمه سنتتیک از قبیل متی‌سیلین، آگراسیلین و نافسیلین منجر شد. متأسفانه طولی نکشید که به دنبال استفاده از این داروها هم، استافیلوکوکوس آرتوس مقاوم به متی‌سیلین پدیدار شد. اولین سویه‌های مقاوم به این قبیل داروها در سال ۱۹۶۱ در انگلستان شناسایی شدند (۷-۹). مقاومت به این داروها ناشی از تولید بتالاکتاماز توسط باکتری نبود، بلکه مربوط به بیان اضافی یک پروتئین باند شونده به پنی‌سیلین به نام PBP_{2a}^۱ بود که از گونه‌های دیگر باکتریایی کسب شد (۱۰). اطلاعات در دسترس نشان داد که ژن ساختمانی این مقاومت به نام mecA کد کننده‌ی PBP_{2a} در سویه‌های مقاوم وجود دارد که در سویه‌های حساس وجود ندارد (۹، ۱۰). سویه‌های MRSA پروتئین‌های باند شونده به پنی‌سیلین (PBP) را تولید می‌کنند که با تمایل پایین به آنتی‌بیوتیک‌های نیمه سنتتیک از قبیل متی‌سیلین متصل می‌شوند، در نتیجه دارو بر روی باکتری اثری نخواهد داشت (۶، ۹). برعکس در باکتری فاقد ژن mecA، این آنتی‌بیوتیک‌ها با تمایل بالا به PBP در دیواره سلولی باکتری باند شده و سبب لیز دیواره سلولی و سرانجام مرگ باکتری می‌گردند (۶، ۹). منشأ ژن mecA، مشابه اسید آمینه‌های بیان شونده توسط ژن mecA استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی مقاوم به متی‌سیلین به نام استافیلوکوکوس سیوری (S.ciuri) می‌باشد (۸). ژن mecA قطعه‌ای به اندازه ۲/۱ کیلو باز است که در ناحیه متحرک ژنومیک به نام SCCmec^۲ قرار دارد. در حال حاضر ۷ تیپ اصلی SCCmec شناسایی شده است (۱۱-۱۴). ژن‌هایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در ناحیه SCCmec وجود دارند که باعث مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های گوناگونی می‌شوند و همچنین این ناحیه (SCCmec) حاوی دو بخش ضروری‌اند که عبارتند از: کمپلکس ژن ccr و کمپلکس ژن mecA (۱۵). ژن‌های ccr^۳ از کلاس invertase resolves هستند و در تمامی کاست‌های کروموزومی ژن مقاومت به متی‌سیلین وجود دارند (۱۶).

¹ penicillin binding protein

² staphylococcal cassette chromosome mec

³ Cassette chromosome recombinase

⁴ Clinical and Laboratory Standards Institute

یافته

۷۳ نمونه استافیلوکوکوس آرتوس جدا شده از دو بخش مراقبت‌های ویژه و اورژانس شامل (۷۱/۲٪) ۵۲ بیمار مرد و (۲۸/۸٪) ۲۱ بیمار زن بودند. افراد بیمار در این تحقیق به ۹ گروه سنی دسته‌بندی شده است که توزیع فراوانی MRSA و MSSA گروه‌های سنی در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است. در این مطالعه بر اساس محل جداسازی نوع عفونت ایجاد شده در بیماران، ۸ نوع نمونه در نظر گرفته شد (جدول شماره ۱)، که میزان شیوع MRSA و MSSA در انواع نمونه‌های بالینی در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است. با توجه به اینکه نمونه‌های جدا شده از بخش‌های مراقبت‌های ویژه و اورژانس بودند. میزان فراوانی MRSA در این بخش‌ها به ترتیب (۹۲/۱٪) ۳۵ و (۸۵/۷٪) ۳۰ است.

جدول شماره (۱): توزیع فراوانی انواع نمونه‌های بالینی استافیلوکوکوس آرتوس

نمونه	فراوانی	درصد فراوانی
زخم	۴۱	۵۶/۲
ادرار	۱	۱/۴
خون	۱۷	۲۳/۳
تراشه	۵	۶/۸
خلط	۱	۱/۴
بال	۵	۶/۸
استخوان	۱	۱/۴
چست تیوپ	۲	۲/۷
کل	۷۳	۱۰۰

میزان مقاومت سویه‌های MRSA و MSSA به ۱۵ آنتی‌بیوتیک مختلف به روش DDA در جدول شماره ۳ ارائه شده است. بیشترین مقاومت مربوط به پنی‌سیلین (۹۴/۵٪) ۶۹ و کوتریموکسازول (۹۰/۴٪) ۶۶ بوده است. در تحقیق حاضر همه‌ی ایزوله‌های استافیلوکوکوس آرتوس حساس به ونکومايسين بودند. همچنین مقاومت چند آنتی‌بیوتیکی به ترتیب به چند دسته آنتی‌بیوتایپ آنتی‌بیوتیکی که در آن به ترتیب به گروه‌های، مقاومت به سه آنتی‌بیوتیک، مقاومت به چهار آنتی‌بیوتیک و تا مقاومت به چهارده آنتی‌بیوتیکی دسته‌بندی شده است که نتایج

- تعیین ژنوتیپی استافیلوکوکوس آرتوس مقاوم به متی سیلین

استخراج ژنوم باکتریایی با استفاده از کیت استخراج ژنوم (No: K-3032، شرکت Bioneer، کره جنوبی) انجام شد. در این روش، باکتری‌ها در محیط LB- Broth به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند و سپس بر اساس دستورالعمل کیت، استخراج ژنوم باکتریایی صورت گرفت (۱۹). در این تحقیق یک جفت آغازگر اختصاصی توسط نرم‌افزار AlleleID (version 6) طراحی و سپس توسط شرکت سیناژن سنتز شد. که مشخصات آغازگرهای طراحی شده به شرح زیر می‌باشد.

mecA-F 5'-TGAGTTGAACCTGGTGAAGTT-3'
mecA-R 5'-TGGTATGTGGAAGTTAGATTGG-3'

تشخیص ژن mecA به طول ۸۵۵ bp با آغازگرهای طراحی شده بهینه سازی و با انجام تعیین توالی تایید شد. شیوع ژن mecA در بین نمونه‌های جدا شده از بیماران، به روش PCR تشخیص داده شد. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل:

PCR ۲/۵ μl، Mgcl2 ۱ μl (۵۰mM)، DDW ۱۶/۵ μl
بافر ۱۰x، dNTPmix ۱ μl (۲/۵mM)، Taq DNA ۱ μl (۵un)، Polymerase (۱۰PM) ۱ μl از هر کدام از آغازگرها انجام شد. واکنش‌های PCR در ترموسایکلر (مدل اپندورف) و با شرایط زیر انجام شد: واسرشت اولیه در دمای ۹۴ °C به مدت ۴ دقیقه و ۳۵ سیکل شامل ۱- باز شدن دو رشته در چرخه، در دمای ۹۴ °C به مدت ۴ دقیقه ۲- اتصال تدریجی آغازگرها به الگو^۱ در دمای ۵۷ °C به مدت ۳۰ ثانیه ۳- ساخت رشته مکمل^۲ در دمای ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه و در پایان چرخه ۳۵ تکمیل رشته ناقص^۳ در دمای ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه. محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد بررسی شد. همزمان از ژنوم استخراج شده از ایزوله MRSA ATCC 43300 به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی نیز استفاده شد.

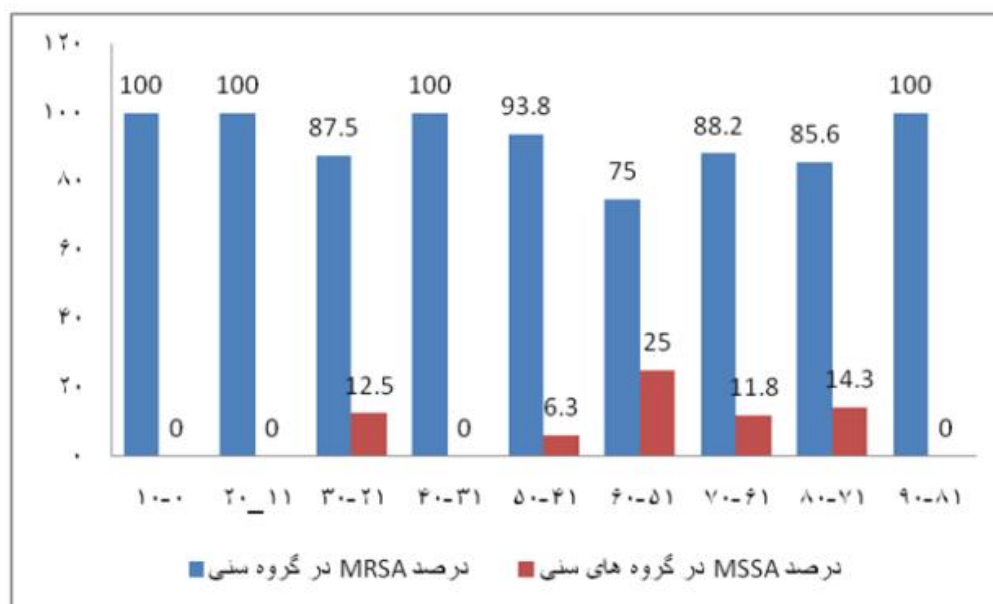
- آزمون آماری

تمامی داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS (V17) و روش Fisher's exact test و χ^2 انجام گرفت که همه موارد با، $P < 0/05$ معنی دار بود.

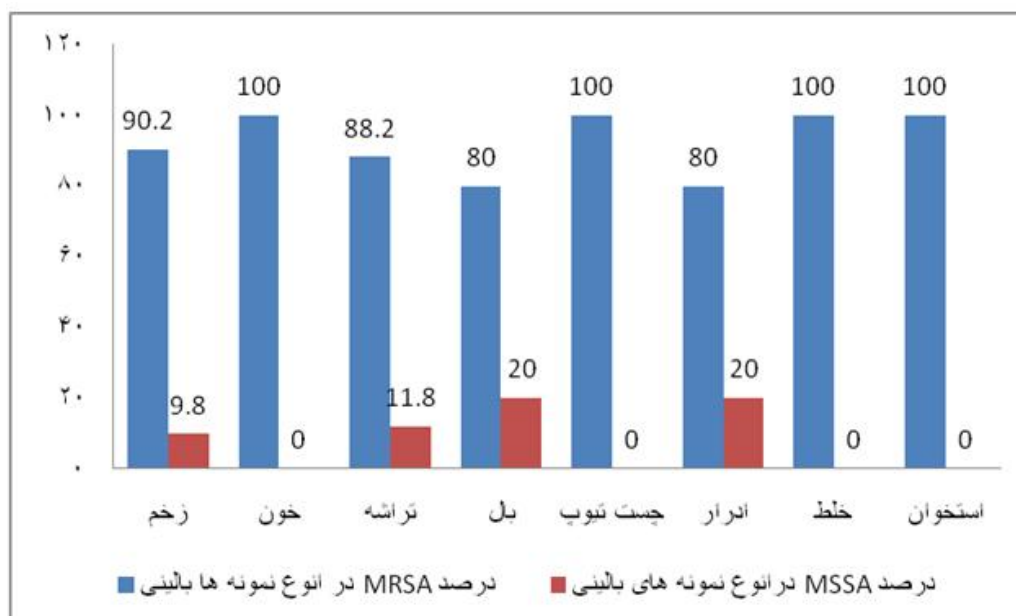
¹ Annealing
² Extension
³ Final Extension

در روش انتشار از دیسک ۵۴(۷۴٪) ایزوله استافیلوکوکوس آرنوس به اگزاسیلین مقاوم بودند (جدول شماره ۲)، اما به روش مولکولی PCR (۸۹٪) ۶۵ سویه دارای ژن *mecA* بودند (شکل ۱).

مقاومت نسبت دسته‌های مقاومت چند آنتی‌بیوتیکی در جدول شماره ۳ نشان داده شده است که در کل (۹۵/۹٪) ۷۰ ایزوله‌های استافیلوکوکوس آرنوس مقاومت به سه آنتی‌بیوتیک و بیشتر از سه آنتی‌بیوتیک را نشان دادند و (۲۰/۵٪) ۱۵ ایزوله مقاومت به همه‌ی چهارده آنتی‌بیوتیک را نشان داده‌اند.



نمودار شماره (۱): توزیع فراوانی MRSA و MSSA در گروه‌های سنی



نمودار شماره (۲): توزیع فراوانی MRSA و MSSA در انواع نمونه‌های بالینی

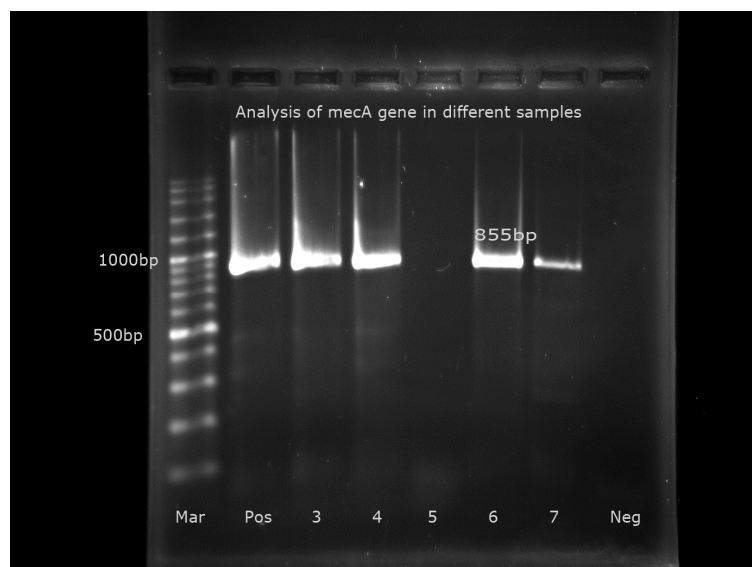
جدول شماره (۲): توزیع فراوانی مقاومت آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در ایزوله‌های MRSA و MSSA با روش دیسک دیفیوژن آگار

آنتی‌بیوتیک‌ها	محتویات دیسک‌ها بر حسب µg	تعداد ایزوله‌های MRSA			تعداد ایزوله‌های MSSA		
		حساس	حد واسط	مقاوم	حساس	حد واسط	مقاوم
اگزاسیلین	۱	۸	۳	۵۴	۸	۰	۰
اریترومایسین	۱۵	۲۱	۵	۳۹	۴	۰	۴
آمپی‌سیلین	۱۰	۹	۳	۵۳	۱	۰	۷
آموکسی‌سیلین	۱۰	۸	۷	۵۰	۰	۰	۸
ایمی‌پنم	۱۰	۲۵	۴	۳۵	۲	۰	۶
پنی‌سیلین	۱۰ units	۱	۰	۶۴	۲	۱	۵
تتراسایکلین	۳۰	۲۰	۴	۴۱	۳	۰	۵
داکسی‌سایکلین	۳۰	۲۴	۱	۴۰	۴	۰	۴
سفترباکسون	۳۰	۲۰	۷	۳۸	۲	۱	۵
سیپروفلوکساسین	۵	۲۹	۰	۳۶	۱	۲	۵
سی‌نوکسین	۱۰۰	۲۹	۳	۳۳	۴	۰	۴
کلرامفنیکل	۳۰	۲۹	۱	۳۴	۵	۰	۳
کلیندامایسین	۲	۲۰	۷	۳۸	۲	۱	۵
کوتریموکسازول	۱/۲۵+۲۳/۷۵	۶	۱	۵۸	۰	۰	۸
ونکومایسین	۳۰	۶۲	۳	۰	۸	۰	۰

جدول شماره (۳): توزیع فراوانی دسته مقاومت چند آنتی‌بیوتیکی (MDR) در سویه‌های MRSA و MSSA

کل	MSSA	MRSA	الگوی مقاومت چند آنتی‌بیوتیک	مقاومت چند آنتی‌بیوتیکی
۰	۰	۰	۱	Non MDRSA
۳	۰	۳	۲	
۱	۰	۱	۳	
۹	۱	۸	۴	
۹	۱	۸	۵	
۱	۰	۱	۶	
۶	۲	۴	۷	
۲	۰	۲	۸	
۲	۰	۲	۹	
۲	۱	۱	۱۰	
۳	۱	۲	۱۱	
۱۰	۲	۸	۱۲	
۱۰	۰	۱۰	۱۳	
۱۵	۰	۱۵	۱۴	
۷۳	۸	۶۵	کل	

Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* (MDRSA)



شکل شماره (۱): نتایج الکتروفورز محصولات PCR ژن *mecA* در ایزوله‌های بالینی بر روی ژل آگاروز ۱٪/۵ درصد. چاهک ۱: Ladder bp ۱۰۰، چاهک ۲: سوش کنترل مثبت، دارای ژن *mecA* (MRSA ATCC 43300)، چاهک ۳ تا ۷: نمونه‌های بالینی استافیلوکوکوس آرنئوس، چاهک ۸: Neg کنترل منفی

بحث و نتیجه‌گیری

یافته‌های ناشی از این بررسی به روش PCR نشان داد که (۸۹٪) ۶۵ از ایزوله‌های استافیلوکوکوس آرنئوس بدست آمده از دو بخش مراقبت‌های ویژه و اورژانس مورد مطالعه، دارای ژن *mecA* هستند. نتیجه سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش DDA نشان می‌دهد که (۸۸/۶٪) ۶۲ از ایزوله‌های MRSA دارای مقاومت چند دارویی هستند که این میزان مقاومت چند آنتی‌بیوتیکی خیلی بالا می‌باشد. همچنین در این بررسی ۳ مورد از ایزوله‌ها کاهش حساسیت به وانکومایسین را هم نشان می‌دهند. در این بررسی علاوه بر استفاده از تعیین حساسیت به دیسک اگزاسیلین به روش DDA در تشخیص ایزوله‌های MRSA، از تکنیک PCR هم استفاده شد، اما به دلیل بیان غیر یکنواخت مقاومت به متی‌سیلین در این قبیل ایزوله‌ها، اغلب این ایزوله‌ها ممکن حساس تفسیر شوند. سویه‌هایی از MRSA که از نظر تعداد و سرعت رشد در یک جمعیت میکروبی ضعیف‌تر از سویه‌های غیر مقاوم رشد می‌کند، بنابراین اغلب به اشتباه MSSA تشخیص داده می‌شوند و همچنین بیان ژن مقاومت به متی‌سیلین خیلی وابسته به شرایط کشت از قبیل درجه حرارت، PH، محیط کشت و محیط کشت حاوی NaCl است در مجموعی این عوامل باعث بیان غیر یکنواخت ژن مقاومت به متی‌سیلین می‌شود که در نهایت ممکن است باکتری مقاوم به متی‌سیلین، حساس به متی‌سیلین تشخیص داده شود (۲۰، ۲۱). علت اصلی استفاده از اگزاسیلین به جای متی‌سیلین در شناسایی سویه‌های MRSA این است، که اگزاسیلین

در طولانی مدت فعالیت خود را حفظ می‌کند. بنابراین در شناسایی سویه‌های هترورزیستانس بهتر از متی‌سیلین است (۲۰). شناسایی صحیح MRSA با روش‌های روتین در آزمایشگاه‌ها مشکل است. به دلیل این که ممکن است سویه‌های مقاوم و حساس در یک کشت به طور همزمان وجود داشته باشند و این هترورزیستانتی به علت رشد ضعیف سویه‌های مقاوم در مقابل سویه‌های حساس در تشخیص ایجاد اشکال می‌کند. به دلیل اینکه روش PCR تحت تأثیر متغیرهای محیط کشت قرار نمی‌گیرد، لذا در تشخیص این سویه‌ها بسیار توانا است (۲۲، ۲۳). بنابراین در این مطالعه بر اساس استفاده از این تکنیک میزان دقیق فراوانی سویه‌های MRSA تعیین شد و با نتایج بررسی فنوتیپی مورد مقایسه قرار گرفت.

در سال ۲۰۰۲ توسط کیم و همکاران طی یک برنامه نظارت سراسری در کشور کره، شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی و کاست‌بندی کروموزومی ژن مقاومت به متی‌سیلین و همچنین پروفایل ژن‌های توکسین در باکتری استافیلوکوکوس آرنئوس، بررسی شد، در این تحقیق ۲۵۲ ایزوله استافیلوکوکوس آرنئوس که توسط روش‌های بیوشیمیایی تایید شده بودند، به دو روش DDA و PCR بررسی شدند. از بین ۲۵۲ ایزوله استافیلوکوکوس آرنئوس جدا شده، ۱۷۲ (۶۸،۳٪) ایزوله، مقاومت به دیسک اگزاسیلین نشان دادند و در بررسی توسط روش PCR، ۱۷۲ (۶۸،۳٪) مورد از ایزوله‌ها دارای ژن *mecA* و ۸۰ سویه فاقد ژن *mecA* تشخیص داده شدند (۲۴). در حالی که در مطالعه ما میزان ایزوله‌های دارای ژن *mecA* در

چند دارویی ۹۵ درصد بوده است (۳۰، ۳۱). اما شیوع MRSA در جامعه ما مشابه یا پایین‌تر از کشورهای اروپایی جنوبی می‌باشد (۳۲). طبق بررسی‌های به عمل آمده، فراوانی سویه‌های MRSA در بیمارستان نمازی شیراز (سال ۱۳۸۱) و دو بیمارستان دیگر در مشهد (سال ۱۳۸۲)، به ترتیب ۴۳ درصد و ۵۳/۵ درصد گزارش شده است (۳۲، ۳۳). بنابراین در این مطالعه، فراوانی MRSA نسبت به سایر بررسی‌های انجام شده در ایران بیشتر است. افزایش MRSA در این تحقیق نشان‌دهنده این است که میزان شیوع MRSA به طور روز افزون در جامعه‌ی ما در حال افزایش است. تلاش برای کنترل کردن MRSA در جامعه، بدون در نظر گرفتن وسعت مخزن آن، می‌تواند فاجعه‌آمیز باشد. شناسایی نواحی شیوع MRSA در هر کشور می‌تواند به تشخیص بین موارد جدید و شیوع محلی کمک کند. این اطلاعات برای طراحی استراتژی‌های موثر برای محدود کردن مخازن MRSA در جامعه مفید است. به طور خلاصه محل جغرافیایی ثابت کرده است که می‌تواند یک فاکتور ریسک برای نشان دادن عفونت‌های MRSA باشد. نقشه‌های جغرافیایی مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌توانند برای راهنمایی پزشکان در انتخاب آنتی‌بیوتیک قبل از آن‌که نتایج کشت در دسترس قرار گیرند بکار رود (۱۷). داده‌های به دست آمده از آنتی‌بیوگرام و روش مولکولی PCR از بیماران بستری شده مورد بررسی در این مطالعه، میزان مقاومت بالا به آنتی‌بیوتیک‌ها و مقاومت چند آنتی‌بیوتیکی را در بخش مراقبت‌های ویژه و اورژانس نشان می‌دهد. با توجه اینکه ممکن است اکثریت بیماران بستری شده در بخش اورژانس و مراقبت‌های ویژه تحت رژیم‌های آنتی‌بیوتیکی تجربی گوناگونی قرار بگیرند، لذا مستعد ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی بیشتری می‌باشند. عامل دیگری که می‌تواند در تحلیل نتایج پژوهش موثر باشد، نظارت ضعیف بر تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها و کمبود روش‌های درمان ضد میکروبی معین در بخش مراقبت‌های ویژه و اورژانس می‌باشد. بنابراین حساسیت و یا مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها باید تعیین شده و بر اساس نتایج هر بخش، نظارت ویژه و روش خاصی برای درمان ضد میکروبی در آن بخش طرح ریزی شود. به دلیل الگوی حساسیت متفاوت در هر بخش باید آنتی‌بیوتیک‌های موثر در درمان MRSA استفاده شوند، در هر صورت کنترل مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها و یا کاهش میزان MRSA، نیازمند یک سیستم نظارت قدرتمند و موثر در سطح هر کشور به صورت مستقل خواهد بود. چه بسا که تا به امروز تدابیر و چاره‌اندیشی در این حیطه محدود به کشورهایی بوده است که در این زمینه نسبت به نقشه‌ی مقاومت آنتی‌بیوتیکی گذشته و حال خود آگاهی دارند. برخی اوقات اختلاف عمده‌ی در میزان شیوع MRSA در کشور ما با سایر کشورهای جهان وجود

مقایسه با نتایج فنوتیپی بیشتر بوده است. به طور کلی دو عامل بر اختلاف بین روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی تأثیر گذار هستند. اولاً هتروزیستانت بودن سویه‌ها و ثانیاً ممکن است ژن‌های تنظیمی ناقص ($mecR_1$ و $mecI$) یا جهش یافته باشند که منجر به سرکوب بیان ژن $mecA$ شوند. همچنین کاست SCCmeca چندین ناحیه IS را از قبیل IS1272 و IS431 در داخل خود حمل می‌کند (۱۱، ۱۲، ۲۵-۲۷). هر دوی این نواحی IS می‌توانند باعث از بین رفتن دو ناحیه انتهایی $mecR_1$ و $mecI$ شوند که این امر سبب دوباره سرکوب شدن ژن $mecA$ می‌شوند (۲۸). همین امر باعث می‌شود که سویه‌های از لحاظ ژنوتیپی دارای ژن $mecA$ باشند ولی از لحاظ فنوتیپی و بیان پروتئین PBP2a سرکوب شده و در نتیجه حساس به دیسک اگزاسیلین بوده است.

کوینگ پینگ و همکارانش در سال ۲۰۱۰، به روش PCR و تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی بر اساس استاندارد CLSI، ۱۱۵ نمونه‌ی بالینی استافیلوکوکوس آرتوس را در یکی بیمارستان‌های آموزشی چین، مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه همه‌ی ایزوله‌های MRSA به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و اگزاسیلین، جنتامیسین، اریتروماسین و سیپرفلوکساسین مقاومت بالایی داشتند و کمترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک داکسی‌سایکلین (۶٪) بود و تمامی ایزوله‌ها به وانکومایسین حساس بودند، و میزان مقاومت چند آنتی‌بیوتیکی خیلی بالا بود. توزیع فراوانی ژن $mecA$ در این تحقیق (۸۰٪) ۹۲ گزارش شده است (۲۹). این در حالی است که در طی دو مطالعه جداگانه فراوانی ژن $mecA$ در شانگهای و مین‌لند چین در سال ۲۰۰۵ به ترتیب ۵۰/۳ درصد و ۸۰/۳ درصد گزارش شده است که حکایت از افزایش شیوع MRSA در چین دارد (۲۹). در حالی که یافته‌های ما نشان می‌دهد که سویه‌های MRSA علاوه بر مقاومت کامل به پنی‌سیلین، مقاومت بالایی نسبت به مقاومت چند دارویی دارند که توزیع فراوانی مقاومت در سویه‌های MRSA به دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی کوتریموکسازول، آمپی‌سیلین و آموکسی‌سیلین به ترتیب (۸۹/۳٪)، (۸۱/۵٪) و (۷۶/۹٪) ۵۰ است.

توزیع فراوانی ژن $mecA$ در این مطالعه (۸۹٪) ۶۵ است. که با تحقیق کوینگ پینگ از نظر میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های فوق شبیه است و همچنین میزان مقاومت چند دارویی در هر دو مطالعه خیلی بالا است که این میزان در مطالعات ما به (۹۵/۹٪) ۷۰ می‌رسد، و میزان شیوع ژن $mecA$ هر دو تحقیق تقریباً مشابه است (۲۹). با توجه به میزان شیوع خیلی بالایی، مقاومت چند آنتی‌بیوتیکی، احتمال می‌رود سویه‌های MRSA در مطالعات ما از بیمارستان منشأ گرفته باشد. در یک مطالعه توسط فتح‌الله‌زاده و همکاران در سال ۲۰۰۸ در تهران میزان مقاومت

ناقل استافیلوکوکوس آرنوس، عدم رعایت مقررات بهداشتی در برخورد با بیماران و در بین کارکنان بیمارستان، عدم مصرف صحیح آنتی‌بیوتیک می‌توان اشاره کرد. بدین ترتیب نتایج به دست آمده از نقاط دیگر جهان نمی‌تواند به طور موثری ما را در زمینه وضعیت سلامت و بهداشت عمومی کشورمان آگاه سازد و بدون شک جهت رسیدن به این اهداف نیاز جدی به مطالعات بیشتر، به خصوص در زمینه اپیدمیولوژی و ژنوتایپینگ مولکولی در کشور ما احساس می‌شود.

دارد. علت تفاوت شیوع MRSA در مطالعه ما، مشابه عللی است که در بسیاری از نقاط جهان وجود دارد. در واقع منشأ این اختلاف عمده، متفاوت بودن میزان شیوع و خطر انتقال MRSA از جامعه و بیمارستان است که در مورد خطر انتقال از جامعه این اختلافات در زمینه سطح اقتصادی اجتماعی مردم ساکن در یک منطقه، مصرف تجربی آنتی‌بیوتیک‌ها، خود درمانی آنتی‌بیوتیکی توسط افراد کم درآمد جامعه و مصرف بی‌رویه داروها توسط مردم می‌باشد، در مورد خطر انتقال از بیمارستان میزان کارکنان خدمات بهداشتی

References:

1. Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. Staphylococcal enterotoxins. *Toxins (Basel)* 2010; 2 (8): 2177-97.
2. Zhang Y, Cheng S, Ding G, Zhu M, Pan X, and Zhang L. Molecular analysis and antibiotic resistance investigation of Staphylococcus aureus isolates associated with staphylococcal food poisoning and nosocomial infections. *African Journal of Biotechnology* 2011; 10 (15): 2965-2972.
3. Zamani A, Sadeghian S, Ghaderkhani J, Alikhani MY, Najafimosleh M, Goodarzi MT. Detection of Methicillin-Resistance (mec-A) Gene in Staphylococcus aureus Strains by PCR and Determination of Antibiotic Susceptibility. *Annals of Microbiology* 2007; 57 (2): 237-276.
4. Merlino J, Watson J, Rose B, Beard-Pegler M, Gottlieb T, Bradbury R, et al. Detection and expression of methicillin/oxacillin resistance in multidrug-resistant and non-multidrug-resistant Staphylococcus aureus in Central Sydney, Australia. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49 (5): 793-801.
5. Lowy FD, Staphylococcus aureus infections. *N Engl J Med* ۱۹۹۸; ۳۳۹ (۸): ۳۲-۵۲۰.
6. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13 (3): 222-35.
7. Berger-Bachi B, Genetic basis of methicillin resistance in Staphylococcus aureus. *Cell Mol Life Sci* ۱۹۹۹; ۵۶ (۱۰-۹): 764-70.
8. Japoni A, Alborzi A, Orafa F, Rasouli M, farshad S. Distribution Patterns of Methicillin Resistance Genes mecA Staphylococcus aureus Isolated from Clinical Specimens. *IBJ* 2000; 4 (8): 173-178.
9. Ortega E, Abriouel H, Lucas R, and Galvez A. Multiple Roles of Staphylococcus aureus Enterotoxins: Pathogenicity, Superantigenic Activity, and Correlation to Antibiotic Resistance. *Toxins (Basel)* 2010; 2 (8): 2117-31.
10. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10 (4): 781-91.
11. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. Genetic organization of the chromosome region surrounding mecA in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated mecI deletion in expression of resistance in mecA-carrying, low-level methicillin-resistant Staphylococcus haemolyticus. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45 (7): 1955-63.
12. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis* 2002; 34(4): 482-92.
13. Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-

- resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46 (7): 2155-61.
14. Oliveira DC, Milheirico C, de Lencastre H. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome mec, SCCmec type VI. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50 (10): 3457-9.
15. Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire mec DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43 (6): 1449-58.
16. Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, and Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 2001; 9 (10): 486-93.
17. Tirabassi MV, Wadie G, Moriarty KP, Garb J, Konefal SH, Courtney R A, et al. Geographic information system localization of community-acquired MRSA soft tissue abscesses. *J Pediatr Surg* 2005; 40 (6): 962-6.
18. Shanmugam S, Selvarajan R, and Thangiah S. Drug Resistance of *Staphylococcus aureus* in Sinusitis Patients. *International Journal of Biosciences* 2011; 1 (3): 63-71.
19. Fouladi AAI, Choupani A, and FallahMehrabadi J. Study of prevalence of Enterotoxin type B gene in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from wound. *Kowsar Medical Journal* 2011; 1 (16): 21-25. Persian
20. Hosainzadegan H, Menati Sh, Tarrahi MJ, Mohammadi F. Screening of Methicillin and Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* in the nasal of hospital p ersonnel of Khorram Abad ,Iran. *Medical laboratory Journal* 2008; 2 (1): 26-32. Persian
21. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99 (11): 7687-92.
22. Booth MC, Pence LM, Mahasreshti P, Callegan MC, Gilmore MS. Clonal associations among *Staphylococcus aureus* isolates from various sites of infection. *Infect Immun* 2001; 69 (1): 345-52.
23. Kanafani Z A, Fowler VG. [*Staphylococcus aureus* infections: new challenges from an old pathogen]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24 (3): 182-93.
24. Kim JS, Song W, Kim HS, Cho HC, Lee KM, Choi MS, et al. Association between the methicillin resistance of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, their staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) subtype classification, and their toxin gene profiles. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 56 (3): 289-95.
25. Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45 (5): 1323-36.
26. Takano T, Higuchi W, Otsuka T, Baranovich T, Enany S, Saito K, et al. Novel characteristics of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains belonging to multilocus sequence type 59 in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52 (3): 837-45.
27. Daum RS, Ito T, Hiramatsu K, Hussain F, Mongkolrattanothai K, Jamklang M, et al. A novel methicillin-resistance cassette in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of diverse genetic backgrounds. *J Infect Dis* 2002; 186 (9): 1344-7.
28. Thong K L, Junnie J, Liew, FY, Yusof MY, Hanifah YA. Antibigrams and molecular subtypes of methicillin-resistant *Staphylococcus*

- aureus in local teaching hospital, Malaysia. J Microbiol Biotechnol 2009; 19 (10): 1265-70.
29. Qing P, Bing H, Shuqin Z, Yuanchun H, Dexing H, Fen Y, et al. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) analysis and antimicrobial susceptibility profiles of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolates in a teaching hospital, Shantou, China. African Journal of Microbiology Research 2010; 4 (9): 844-848.
30. Fatholahzadeh B, Emaneini M, Gilbert G, Udo E, Aligholi M, Modarressi MH, et al. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) analysis and antimicrobial susceptibility patterns of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolates in Tehran, Iran. Microb Drug Resist 2008; 14 (3): 217-20.
31. Ko KS, Lee JY, Suh JY, Oh WS, Peck KR, Lee NY. Distribution of major genotypes among methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones in Asian countries. J Clin Microbiol 2005; 43 (1): 421-6.
32. Naderinasab M, Tavakol Afshari J, Nazem M, Fatehmanesh P, Faramarzi H, Khodadost MA. Determination of methicillin resistant Staphylococcus aureus via phenotypic methods. Medical Journal of Mashhad University of Medical Sciences 2005; 87 (48): 7-16. Persian
33. Japoni A, Alborzi A, Rasouli M, Pourabbas B. Modification DNA extraction for rapid PCR detection of methicillin-resistant Staphylococci. Iranian Biomed J 2004; 8 (3): 161-165.

PREVALENCE OF METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS BY DISK DIFFUSION AND MOLECULAR METHODS IN ICU AND EMERGENCY SECTIONS IN ONE OF EDUCATIONAL HOSPITAL, TEHRAN

Shafie Ghorbani Tazhandare¹, Abbas Ali Imani Fooladi², Mohammad Reza Nourani³

Received: 02 Dec, 2012; Accepted: 19 Feb, 2013

Abstract

Background: Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MSRA) is one of the main causes of serious infections in Iran and other countries. Treatment of these infections has become more difficult because of resistance to most antibiotics. The aim of this study was to determine the incidence of methicillin-resistance gene in *S. aureus* isolates and antibiotic susceptibility to oxacillin and other antibiotics were performed by Disc Diffusion Agar (DDA).

Materials and Methods: This study was carried out on SA isolates (n=73) collected from the clinical samples at during 2011 in ICU and Emergency sections. All *S. aureus* isolates was identified after performing by routine laboratory procedures including, Gram stain, catalase test, DNase production, coagulase activity and mannitol salt fermentation. In this study used to identify Phenotypic by Disc Diffusion Agar (DDA) and for identify genotypic two pairs of primers designed by AlleleID software (version 6) on the basis of published DNA sequences of the *S. aureus* gene. Synthesis of primers was carry out by Cinnagen Company, Iran. PCR reaction of *mecA* with designed primers was optimized and incident of *mecA* was studied in clinical samples in ICU and Emergency sections.

Results: The PCR analysis of 73 *S. aureus* isolates originated from patients for *mecA* showed 65 (89%) cases were positive. But only 54 (74%) isolates were methicillin resistant when we used the DDA method.

Conclusion: As a conclusion, the resistance to methicillin of *S. aureus* in Baqiyatallah hospitals has reached to 89% and more than 95% of them were multidrug resistance.

Key words: *Staphylococcus aureus*, antibiotic resistant, Methicillin, MRSA.

Address: Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Email: imanifouladi.a@gmail.com

SOURCE: URMIA MED J 2013; 24(2): 120 ISSN: 1027-3727

¹ MSc in Microbiology, Microbiology Department, Islamic Azad University, Zanjan Branch, Zanjan, Iran

² Associate Professor, Applied Microbiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Associate Professor, Chemical Injury Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran